



Overlevelse af coliforme bakterier i drikkevand

Christensen, Sarah Christine Boesgaard; Albrechtsen, Hans-Jørgen

Publication date:
2015

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Christensen, S. C. B., & Albrechtsen, H-J. (2015). *Overlevelse af coliforme bakterier i drikkevand*. DTU Miljø.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Overlevelse af coliforme bakterier i drikkevand

Sarah C.B. Christensen og Hans-Jørgen Albrechtsen

DTU Miljø, Danmarks Tekniske Universitet

Juli 2015

Baggrund

Fra september 2014 har Halsnæs Vandforsyning registreret forekomst af coliforme bakterier i ledningsnettet. De coliforme bakterier er blevet identificeret som *Serratia* sp., og specifikke arter indenfor denne slægt er kendt for at kunne overleve og i nogle tilfælde vokse i akvatiske miljøer (Grimont & Grimont 2006). Det har ikke været muligt at identificere kilden til de coliforme bakterier eller at fjerne dem ved skylning af ledningsnettet. DTU Miljø blev derfor kontaktet af Halsnæs Forsyning i foråret 2015 med henblik på at designe og udføre et studie, der kunne belyse forureningssagen.

Formål

Formålet med studiet var at undersøge, hvorvidt coliforme bakterier isoleret fra Halsnæs Vandforsynings distributionssystem kunne overleve og eventuelt opformeres i drikkevand. Fokus blev rettet mod mulige kilder for vækst såsom PE rør, PVC rør, gummimateriale i samlemuffer samt drikkevandssediment.

Materialer og metoder

Forsøgsdesign

Coliforme bakterier i vandprøver og biofilm på PVC rør, PE rør samt gummiringe fra ledningsnettet blev kvantificeret ved hjælp af Colilert18 (Idexx). Fra en enkelt prøvetagningshane blev 20 liter vand udtaget til anvendelse i overlevelses-/vækstforsøg. Forsøgene blev designet til at sammenligne forskellige faktoreres betydning for overlevelse/vækst af coliforme bakterier. De undersøgte faktorer var: tilstedeværelse af drikkevandssediment, tilstedeværelse af gummistykker, PE rør og PVC rør fra ledningsnettet samt tilsætning af næringsmedie. Temperaturen blev holdt konstant ved 10 °C, men derudover blev et enkelt forsøg udført ved 4 °C og et ved 15 °C. Alle forsøg blev udført på DTU Miljø.

Prøvetagning på ledningsnet samt analyser

Vandprøver samt rørstykker blev udtaget i samarbejde mellem Halsnæs Vandforsyning og DTU Miljø. Vandprøver blev taget fra officielle prøvetagningshaner etableret ved indgang til husstand. Vandet løb ved jævnt flow til konstant temperatur, inden prøven blev taget direkte i 100 ml antifoam prøvetagningsglas (Idexx).

Der blev udtaget 20 liter vand i syrevaskede og glødede (560 °C, 6 timer) blue-cap flasker til overlevelses-/vækstforsøg fra prøvetagningshanen på Kirkebakken 17. Før og efter prøvetagningen blev der udtaget 100 ml vand i antifoam prøvetagningsglas til kvantifikation ved Colilert18.

Prøverne blev transporteret i køletasker til DTU Miljø's mikrobiologiske laboratorium og analyseret indenfor 5 timer. Til kvantifikation blev Colilert18 og Quanti-Tray/2000 (Idexx) anvendt i henhold til producentens anvisninger. Ved anvendelse af Quanti-Tray/2000 angives koncentrationerne som MPN (most probable number). Prøverne blev inkuberet i 21 timer og 45 minutter \pm 15 minutter.

Drikkevandssediment blev opsamlet fra bunden af rentvandsbeholderen på Lynæs Vandværk (Fig. 1), der siden januar 2013 har været taget ud af drift. Beholderen blev tømt ned inden prøvetagning, og sedimentet blev opsamlet manuelt med sterile pipetter og teskeer og opbevaret i 1 liters syrevaskede og glødede blue-cap flasker i køletasker. To sedimentprøver af 2,5 g (vådvægt) blev analyseret med Colilert18 ved at udryste sedimentet i 100 ml autoklaveret hanevand i antifoam prøvetagningsglas og hælde vand med sediment i Quanti-Tray/2000 plader. Prøverne blev inkuberet i 21 timer og 45 minutter \pm 15 minutter.



FIGUR 1. INDSAMLING AF DRIKKEVANDSSEDIMENT I NEDTØMT RENTVANDSBEHOLDER PÅ LYNÆS VANDVÆRK.

Et rørstykke på Kirkevej bestående af samlemuffe med gummi-læberinge, et PE rørstykke og et PVC rørstykke blev gravet fri og skåret ud (Fig. 2). Biofilmprøver fra PE rør (indre diameter: 40 mm), PVC rør (indre diameter: 46 mm) og gummiring blev udtaget som skrab med sterile vatpinde direkte efter udskæring. Ved skrab sad gummiringen stadig i samlemuffen. På Halsnæs Vandforsynings værksted blev rør og muffer trukket fra hinanden og rørene skåret i stykker på $5,5 \pm 1$ cm. Rørstykker og gummimembraner blev transporteret i rene forseglede poser i køletasker til DTU Miljø.



FIGUR 2. RØRSTYKKE PÅ KIRKEVEJ MED SAMLEMUFFE, PE RØR OG PVC RØR FØR UDSKÆRING.

Biofilmprøver blev opbevaret i køletaske i syrevaskede og glødede glas med autoklaveret hanevand ved at placere vatpinde med skrab på i glassene, der var forberedt i sterilbænk på DTU Miljø forinden.

Biofilmprøver blev udrystet ved whirlmixing i ca. 60 sekunder. Vand med udrystet biofilm blev overført til 100 ml antifoam glas og fyldt til 100 ml mærket med autoklaveret hanevand. Derefter blev Colilert18 udført som beskrevet tidligere.

Opsætning af laboratorieforsøg samt analyser

Der blev opsat 15 stk. 1 liters syrevaskede og glødede bægerglas til overlevelses-/vækstforsøg (Tabel 1). Bægerglassene var dækket af kraftig alufolie, der var blevet glødet sammen med glassene.

TABEL 1. FORSØGSOPSTILLING MED 15 BÆGERGLAS TIL UNDERSØGELSE AF FORSKELLIGE PARAMETRES BETYDNING FOR OVERLEVELSE/VÆKST AF COLIFORME BAKTERIER.

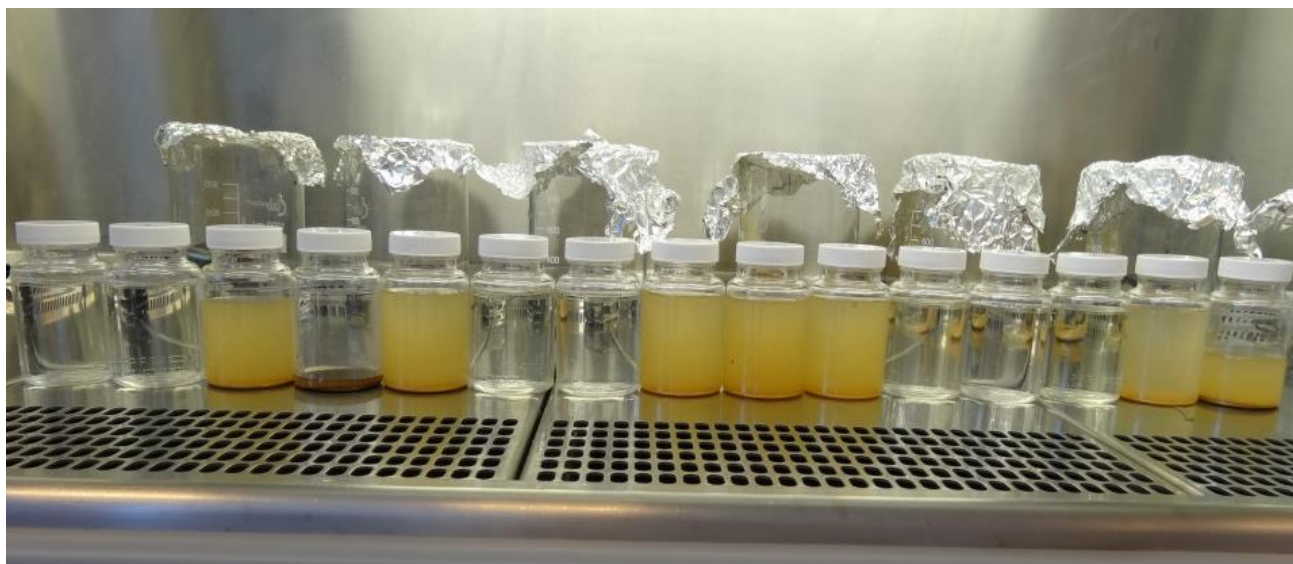
Prøve	Vand (ml)	Sediment (ml) fra Lynæs	Sediment (ml) fra Odense	<i>Serratia</i> tilsat	Næring tilsat	Gummi	PE	PVC	10 °C	4 °C	15 °C
1	800								x		
2	800			x					x		
3	750	50							x		
4	750		50						x		
5	750	50							x		
6	800					x			x		
7	800					x			x		
8	750	50				x			x		
9	750	50				x			x		
10	750	50				x	x		x		
11	800				x	x			x		
12	800						x		x		
13	800							x	x		
14	750	50								x	
15	750	50									x

I glas med sediment og vand blev der tilsat 50 ml sediment fra Lynæs Vandværk og 750 ml vand fra Kirkebakken 17, og i glas uden sediment blev der tilsat 800 ml vand fra Kirkebakken 17. I et enkelt glas stammede sedimentet fra en rentvandsbeholder i Odense for at sammenligne forskellige sedimenttyper. To glas blev tilsat PE rørstykker på 4,5 og 5,3 cm og et glas blev tilsat et PVC rørstykke på 6,5 cm. I et enkelt glas blev der tilsat ekstra *Serratia* fra en kultur, der var isoleret fra Halsnæs Vandforsyning i december 2014. På trods af at kulturen var podet i Trypticase Soja Bouillon ca. 40 timer inden forsøgsopsætning ved 37 °C på rystebord, blev der ved mikroskopi kun registreret få aktive *Serratia*, hvorfor tilsætningen ikke gav en signifikant forhøjet koncentration af *Serratia*. I et enkelt glas blev der tilsat ekstra næringsmedie i form af Trypticase Soja Bouillon svarende til en koncentration af tilgængeligt kulstof for bakterievækst på 1400 µg C/liter. Bægerglassene blev inkuberet i klimarum ved 10 °C bortset fra et enkelt ved 4 °C og et ved 15 °C.

Efter 21 dages forsøgsperiode blev der tilsat næring til glas 1, 3, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14 og 15 i form af Trypticase Soja Bouillon (60 µg tilgængeligt C/L).

Efter yderligere 15 dage blev der tilsat høje koncentrationer af Trypticase Soja Bouillon (1400 µg tilgængeligt C/L) til alle glas på nær glas 9.

Der blev udtaget vand og sedimentprøver til Colilert18 analyse fra forsøgsstart og løbende over tid i halvanden måned. Vandprøver på 50 ml blev udtaget i antifoam prøvetagningsglas med sterile 50 ml pipetter. Derefter blev 1-2 ml sedimentprøve udtaget med sterile 2 ml engangspipetter i antifoam prøvetagningsglas. I såvel vand- som sedimentprøver blev glassene fyldt op til 100 ml mærket med autoklaveret hanevand (Fig. 3). Visuel inspektion af Colilert18 prøver i Quanti-Tray/2000 "brønde" viste, at der ikke var korrelation mellem positive "brønde" og "brønde", der lå synligt sediment i, hvorfor vi antager, at bakterierne på sedimentoverflader var rystet ud i vandet ved Colilert18 analyser.



FIGUR 3. COLILERT18 PRØVER MED SEDIMENT OG VAND. BAGVED SES SEKS BÆGERGLAS FRA VÆKST-/OVERLEVELSESFORSØG.

Der blev udført mikroskopi på enkelte positive colilert18 prøver for at udføre visuel kontrol af bakteriekulturerne. Sedimentprøver blev ligeledes mikroskoperet ved forsøgets afslutning med henblik på at registrere eventuelle protozoer (encellede organismer).

Afslutningsvis blev der målt ATP-indhold (Adenosin Trifosfat) i vand, sediment og biofilm. ATP er et energibærende molekyle, der findes i alle levende celler. Måling af ATP er således en ikke-selektiv metode til at bestemme al celleaktivitet. ATP-koncentrationen kan ikke omsættes direkte til bakterieantal, da ATP-indholdet i forskellige bakterier kan variere bl.a. mellem arter og varierende næringstilstand. Prøverne blev analyseret for totalt og frit ATP på Advance Coupe instrument (luminometer) fra Celsis med LuminEX/LuminATE reagens-kit (Celsis No. 92687). ATP-koncentrationer blev bestemt ud fra standardkurver i intervallerne 0-10, 0-100 og 0-1000 pg ATP/ml med ATP standarder (Celsis No. 92588) fremstillet i sterilfiltreret autoklaveret postevand.

Med henblik på at identificere den coliforme bakterie blev 16S ribosomal DNA sekventeret og sammenlignet med sekvenser fra de internationale databaser GenBank (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) og EzBioCloud (www.ezbiocloud.net). DNA fra bakterierne blev ekstraheret ved to gange skiftevis kogning (100 °C, 10 min.) og frysning (-80 °C, 10 min.). Før fryse-/kogebehandling blev cellerne vasket i DNA-frit vand og centrifugeret ved 10.000 rpm. i 10 min. Efter fryse-/kogebehandling blev cellerne vortexet i 15 sek. ved 2000 rpm. og centrifugeret i 10 min. ved 10.000 rpm. PCR (Polymerase Chain Reaction) blev udført på Biometra T3000 ThermoCycler efter følgende protokol: Denaturering ved 94° C i 3 min. efterfulgt af 36 cykler ved 94 °C (30 sek.), 56 °C (30 sek.) og 72 °C (2 min.) og en afsluttende forlængelses-reaktion i 10 min. ved 72 °C. Derefter nedkøling ved 4 °C, indtil prøven blev udtaget. PCR mix (25 µl) bestod af 2 ng DNA template, 0,2 units Taq polymerase (D1806 Sigma, Taq DNA Polymerase fra *Thermus aquaticus*) med 10 × PCR reaktions buffer med MgCl₂, 12.5 pmol af hver primer (27F, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' og 1492R, 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), D7295 Sigma, Deoxynucleotide Mix, 10 mM, Molecular Biology Reagent samt W3513 Sigma, Water, BioPerformance Certified. PCR produktets længde og renhed blev kontrolleret ved gel-elektroforese, hvorefter koncentrationen og kvaliteten af DNA i produktet blev bestemt på NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) ved en absorbans på 260/280 nm. PCR produktet blev sendt til oprensning og sekventering hos Macrogen (Seoul, Sydkorea).

Resultater

Forekomst af coliforme bakterier i ledningsnettet

Alle vandprøver udtaget på ledningsnettet d. 29. april 2015 indeholdt coliforme bakterier (Tabel 2).

TABEL 2. KONCENTRATION AF COLIFORME BAKTERIER I VANDPRØVER UDTAGET PÅ LEDNINGSNETTET 29. APRIL 2015.
*PRØVEN FRA PEDER MADSENSVEJ BLEV TAGET VED SKYLNING FRA BRANDSLANGE OG IKKE FRA FORBRUGERHANE, SOM ER NORMAL PROCEDURE.

Prøvetagningssted	Coliforme [MPN/100 ml]
Kirkebakken 4	291
Kirkebakken 23	49
Kirkebakken 17 før udtagning af 20 liter prøve	33
Kirkebakken 17 efter udtagning af 20 liter prøve	52
Kirkebakken 7	249
Peder Madsensvej*	4

Ved udsækning af rørstykker fra røret førende til Kirkebakken 4 blev vandet, der løb ud ved oversækningen, opsamlet. Det indeholdt mere sediment end prøver udtaget ved prøvetagningshaner og var derfor svagt lysebrunt. Koncentrationen af coliforme bakterier i vandet var 517 MPN/100 ml. Det kan dog ikke udelukkes at den høje koncentration til dels skyldes, at prøven ikke er taget fra prøvetagningshane.

Biofilm på PVC rør, PE rør og gummi-læbering, der sad i samlemuffen mellem PE- og PVC røret, indeholdt alle coliforme bakterier (Tabel 3).

TABEL 3. KONCENTRATION AF COLIFORME BAKTERIER I BIOFILM FRA RØRSTYKKER OG GUMMI-LÆBERING UDTAGET PÅ KIRKEBAKKEN D. 29. APRIL 2015.

Prøve	Coliforme [MPN/cm ²]
Biofilm på PVC rør	30
Biofilm på PE rør	4
Biofilm på gummi-læbering	17

Drikkevandssediment, der var indsamlet til anvendelse i overlevelses-/vækstforsøg, indeholdt ikke coliforme bakterier.

Artsidentifikation

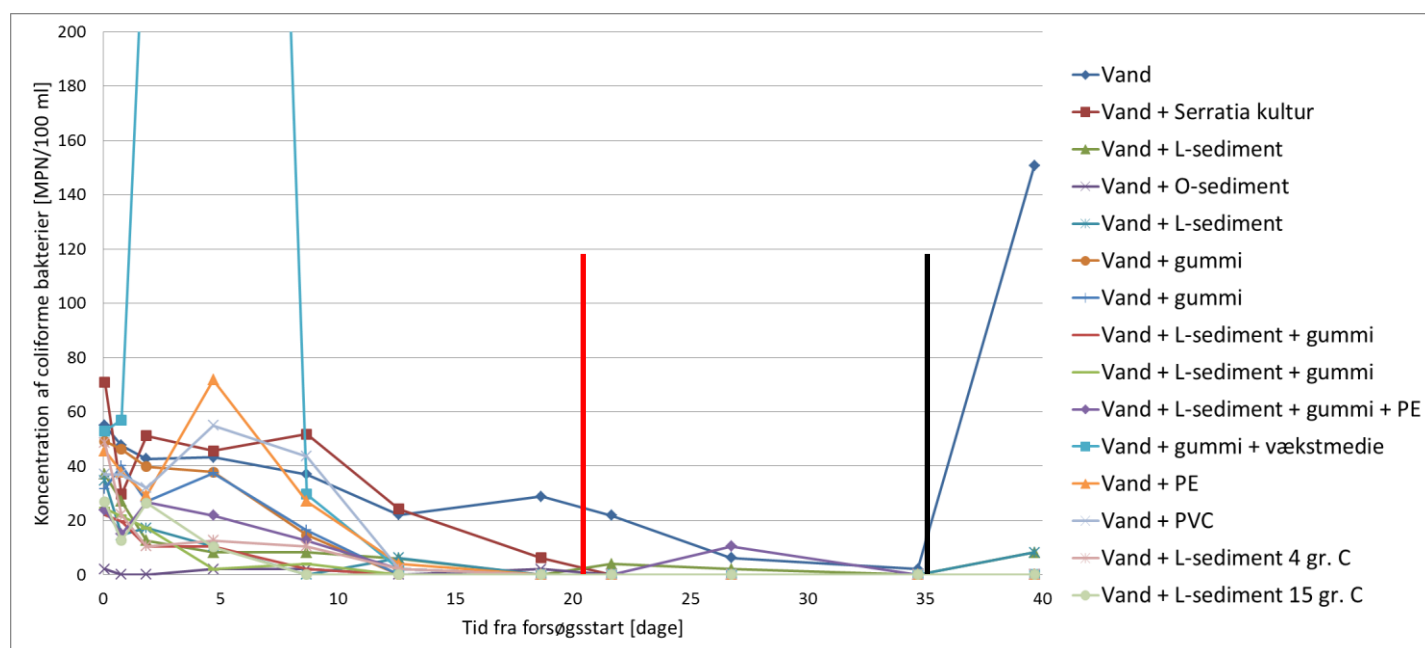
Analyse af 16S ribosomal DNA fra tre vandprøver udtaget i april 2015 og en prøve udtaget december 2014 viste, at der var 100 % identitet mellem DNA sekvenserne fra de fire bakterier. Derudover var den nærmest beslægtede bakterie i den verificerede database EzBioCloud *Serratia fonticola* med 98,4 % lighed. Det kan ikke på baggrund af 98,4 % lighed konkluderes med sikkerhed, at det er samme art, men det er den nærmest beslægtede art. *Serratia fonticola*, der første gang blev beskrevet i 1979 (Gavini et al. 1979), er en stavformet, gram-negativ og fakultativt anaerob coliform bakterie indenfor familien *Enterobacteriaceae*. Derudover er den en atypisk coliform, der kan vokse ved lave temperaturer (registreret ned til 4 °C). *Serratia fonticola* producerer ikke rødt pigment, som flere andre *Serratia* arter. *Serratia fonticola* er langsomt-voksende, hvilket også sås i disse studier ved svag gul farvning af Colilert18 prøverne indenfor den forskrevne tidramme for aflæsning på 20±2 timer. Efter 18 timer kunne der som hovedregel kun observeres svagt positive prøver, hvorfor vi konsekvent først aflæste prøverne efter 21½ - 22 timer. *Serratia fonticola* kan nedbryde laktose, men Halsnæs Vandforsyning har konstateret, at den ikke blev registreret ved membranfiltreringsmetoden (DS/EN ISO 9308-1). Dette kan ligeledes skyldes den langsomme vækst, der medfører, at den forskrevne tidsramme for tælling (21±3 timer) ikke er tilstrækkelig til, at der fremkommer synlig gulfarvning på Tergitol agar. Der har tidligere været stillet spørgsmål ved, hvorvidt *Serratia fonticola* tilhører *Serratia* slægten, men 16S ribosomal DNA sekvensanalyser har for nyligt bekræftet dens tilhørsforhold til slægten (Carneiro et al. 2013).

Serratia fonticola er mest almindeligt forekommende i ferskvandsmiljøer og jord (Carneiro et al. 2013) og er i et enkelt tilfælde blevet identificeret i kommercielt mineralvand (Tasic et al. 2013). Tilfælde af patogene *Serratia fonticola* fra drikkevand er ikke beskrevet i gængs videnskabelig litteratur, men publicerede undersøgelser viser, at *Serratia fonticola* er en opportunistisk patogen bakterie (Carneiro et al. 2013), hvilket vil sige en bakterie, der kun kan medføre sygdomme hos særligt immunsvækkede personer.

Observationerne stammer typisk fra sårinfektioner hos immunsvækkede personer (Bollet et al. 1991). *Serratia fonticola* er ikke registreret i forbindelse med gastro-intestinale infektioner via drikkevand (WHO 2011). Naturstyrelsen (Guldbæk & Bagge 2007) beskrev *Serratia fonticola* i Danmark som almindeligt forekommende i ferskvand og med følgende sundhedsmæssige vurdering: "Hovedårsagen til humane infektioner, forårsaget af arter af *Serratia*, er forbundet med hospitalsmiljøet. *Serratia fonticola*, som kan isoleres fra vand, er ikke hidtil blevet påvist i kliniske prøver."

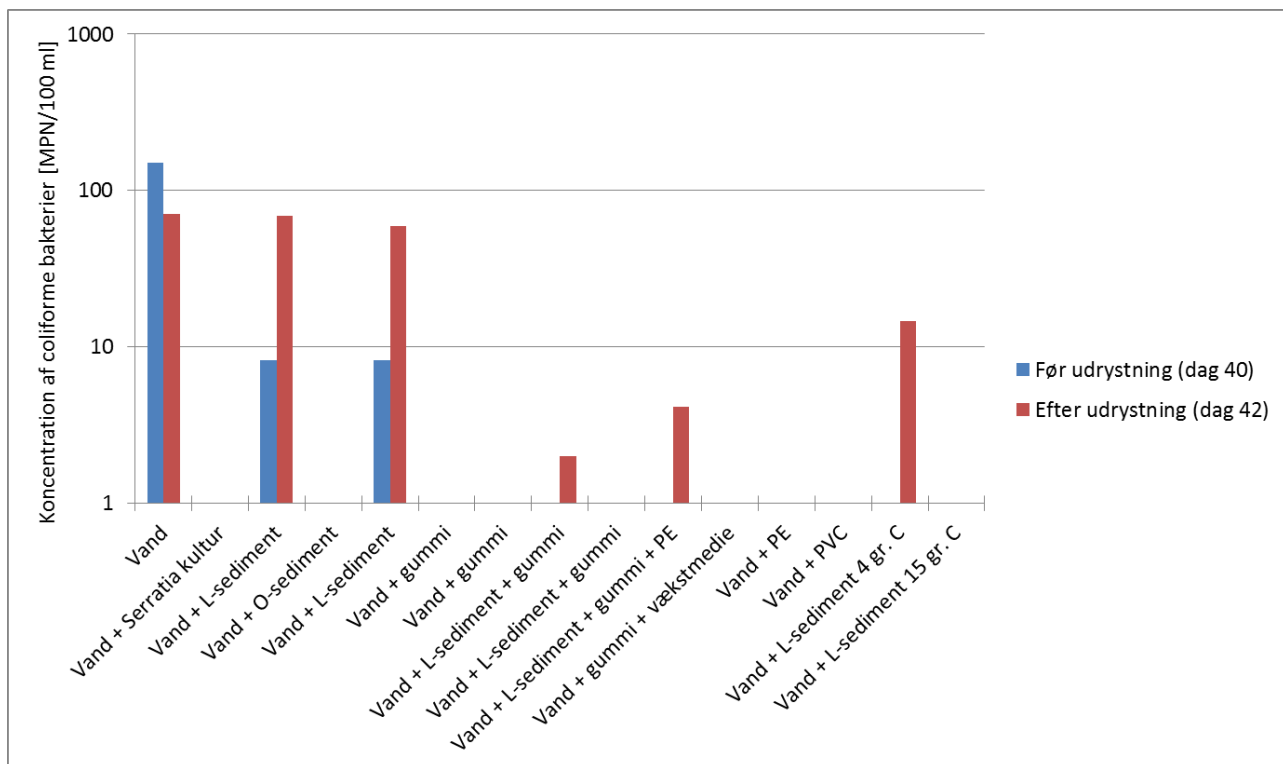
Overlevelses/vækstforsøg

I alle 15 forsøgsglas faldt koncentrationen af coliforme bakterier over tid (Fig. 4). Vækst blev kun registreret ved tilsætning af høje koncentrationer af næringsmedie såsom 1400 µg tilgængeligt C/L tilsat i et enkelt glas ved forsøgsstart. Dette ses som den høje koncentrationsstigning i forsøgets begyndelse (lyseblå kurve for vand + gummi + vækstmedie) efterfulgt af et fald. Der blev målt en koncentration på 1034 MPN/100 ml, hvilket svarer til en koncentrationsstigning på ca. faktor 20 på fire dage. Efter 21 dage tilsatte vi 60 µg tilgængeligt C/L i 11 af 15 glas uden en målbar effekt, mens en koncentration på 1400 µg tilgængeligt C/L tilsat efter yderligere 15 dage medførte kraftig vækst i vandprøver fra glasset med vand alene og moderat vækst i vandprøver fra de to glas med vand og sediment fra Lynæs Vandværk. Tilførsel af næring har i dette studie været den mest betydende faktor for vækst af coliforme bakterier.



FIGUR 4. KONCENTRATION AF COLIFORME BAKTERIER I VANDFASEN I ALLE FORSØGSGLAS. RØD BAR VISER TIDSPUNKT FOR TILSÆTNING AF EKSTRA NÆRINGSMEDIE I LAV KONCENTRATION. SORT BAR VISER TIDSPUNKT FOR TILSÆTNING AF EKSTRA NÆRINGSMEDIE I HØJ KONCENTRATION. L-SEDIMENT ER DRIKKEVANDSSSEDIMENT FRA LYNÆS, O-SEDIMENT ER DRIKKEVANDSSSEDIMENT FRA ODENSE. FORSØGSGLASSENE BLEV INKUBERET VED 10 °C, HVOR INGEN TEMPERATUR ER ANFØRT.

Det er vigtigt at bemærke, at Figur 4 viser koncentrationen i vandfasen. Inden forsøget blev afsluttet, blev alle glas rystet på dag 42 for at suspendere sedimentet i vandfasen og måle koncentrationen af coliforme bakterier i suspensionen (Fig. 5).



FIGUR 5. KONCENTRATION AF COLIFORME BAKTERIER I VANDFASEN PÅ DAG 40 SAMT PÅ DAG 42 EFTER ALLE FORSØGSGLAS VAR BLEVET RYSTET OG SEDIMENT OG EVT. BIOFILM DERMED SUSPENDERET I VANDFASEN. L-SEDIMENT ER DRIKKEVANDSSSEDIMENT FRA LYNÆS, O-SEDIMENT ER DRIKKEVANDSSSEDIMENT FRA ODENSE. FORSØGSGLASSENE BLEV INKUBERET VED 10 °C, HVOR INGEN TEMPERATUR ER ANFØRT.

Efter denne udrystning blev coliforme bakterier registreret i yderligere tre glas i forhold til før udrystningen. Alle disse alle glas indeholdt sediment. I 15 graders prøven, hvori der også var sediment, blev der ikke målt coliforme bakterier efter udrystning. I dette glas er der ikke registreret coliforme bakterier i vandfasen efter dag 5.

I glas med PE rør og PVC rør alene blev der ikke registreret coliforme bakterier ved forsøgets afslutning. Heller ikke i biofilmen (Fig. 6) på rørene blev der målt coliforme bakterier ved forsøgets afslutning (Tabel 4).



FIGUR 6. PVC RØR (VENSTRE) OG PE RØR (HØJRE) VED OVERLEVELSE-/VÆKSTFORSØGETS AFSLUTNING.

Biofilmen bestod af andre bakterier end coliforme bakterier, hvilket blev påvist ved ATP måling, der måler den totale mikrobielle aktivitet (Tabel 4).

TABEL 4. KONCENTRATION AF COLIFORME BAKTERIER I BIOFILM PÅ PE RØR OG PVC RØR VED UDTAGNING FRA LEDNINGSNET SAMT OVER TID I OVERLEVELSES-/VÆKSTFORSØG. TOTAL MIKROBIEL AKTIVITET ER BESTEMT SOM TOTAL ATP EFTER 42 DAGE

Rørmateriale	Tilsat i forsøgsglas med rør	Coliforme bakterier [MPN/cm ²]			Total ATP [pg ATP/cm ²]
		Dag 0	Dag 22	Dag 42	Dag 42
PE	Vand + sediment + gummi	4	0,2	0	34
	Vand		0,1	0	83
PVC	Vand	30	0,7	0	11

Heller ikke tilstedeværelse af gummistykker i forsøgsglassene medførte øget overlevelse eller vækst af coliforme bakterier (Fig. 5 og Tabel 5). Der voksede dog en tydelig slimet biofilm på gummistykkerne (Fig. 7) men der blev ikke målt højere koncentrationer end 0,1 coliform bakterie/cm² i denne biofilm ved forsøgets afslutning. Derimod blev der målt høje koncentrationer af ATP (Tabel 5).



FIGUR 7. STYKKE AF GUMMI-LÆBERING MED SEDIMENT OG BIOFILM PÅ OVERFLADEN.

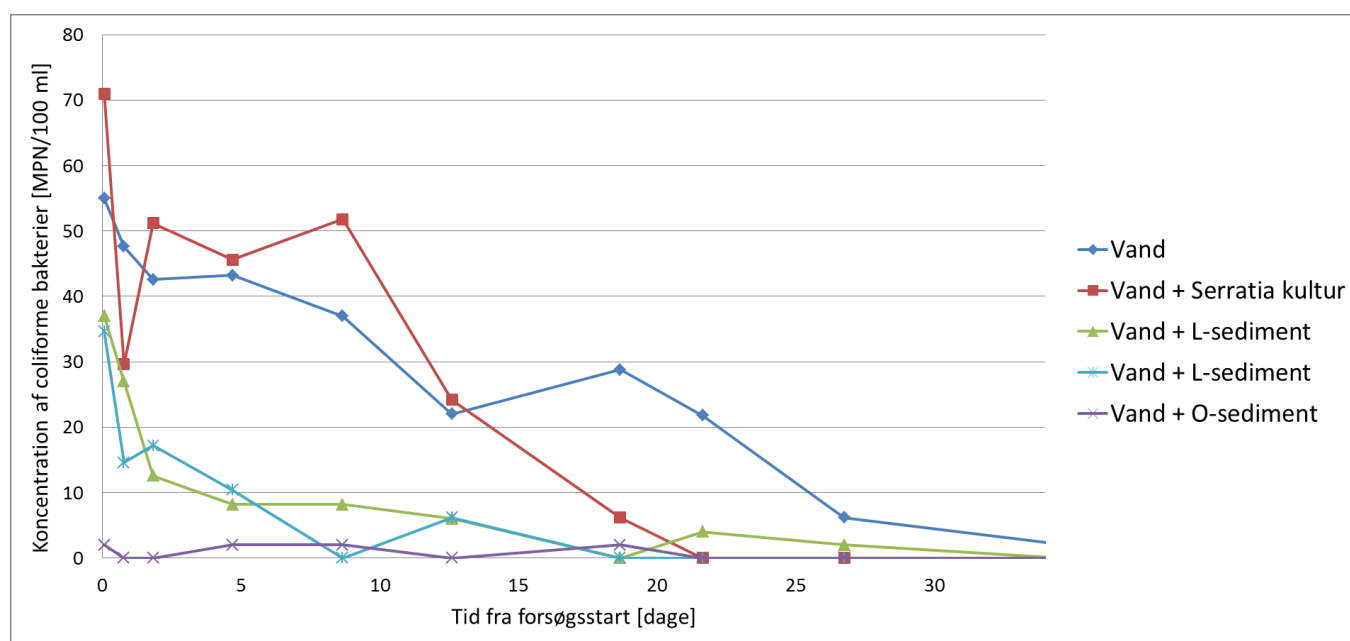
TABEL 5. KONCENTRATION AF COLIFORME BAKTERIER I BIOFILM PÅ GUMMIRING VED UDTAGNING FRA LEDNINGSNET SAMT OVER TID I OVERLEVELSES-/VÆKSTFORSØG. TOTAL MIKROBIEL AKTIVITET ER BESTEMT SOM TOTAL ATP EFTER 42 DAGE. I ALLE GLASSENE VAR DER TILSAT TRE STYKKER GUMMI.

Tilsat i forsøgsglas med gummistykker	Coliforme bakterier [MPN/cm ²]			Total ATP [pg ATP/cm]
	Dag 0	Dag 19	Dag 42	Dag 42
Vand + gummi	17	0	0,04	255
Vand + gummi		0	0	284
Vand + gummi + sediment		0	0,07	39
Vand + gummi + sediment		0,5	0	42
Vand + gummi + sediment + PE		0,5	0,03	29
Vand + gummi + vækstmedie		6,1	0,11	1906

Koncentrationen af coliforme bakterier på gummiringe og rør var således højest umiddelbart efter udtagning af materialerne fra ledningsnettet. Over tid fald koncentrationen på alle materialer i vækstforsøgene (Tabel 4 og 5). Dette studie har derfor ikke påvist, at gummimembraner, PE rør eller PVC

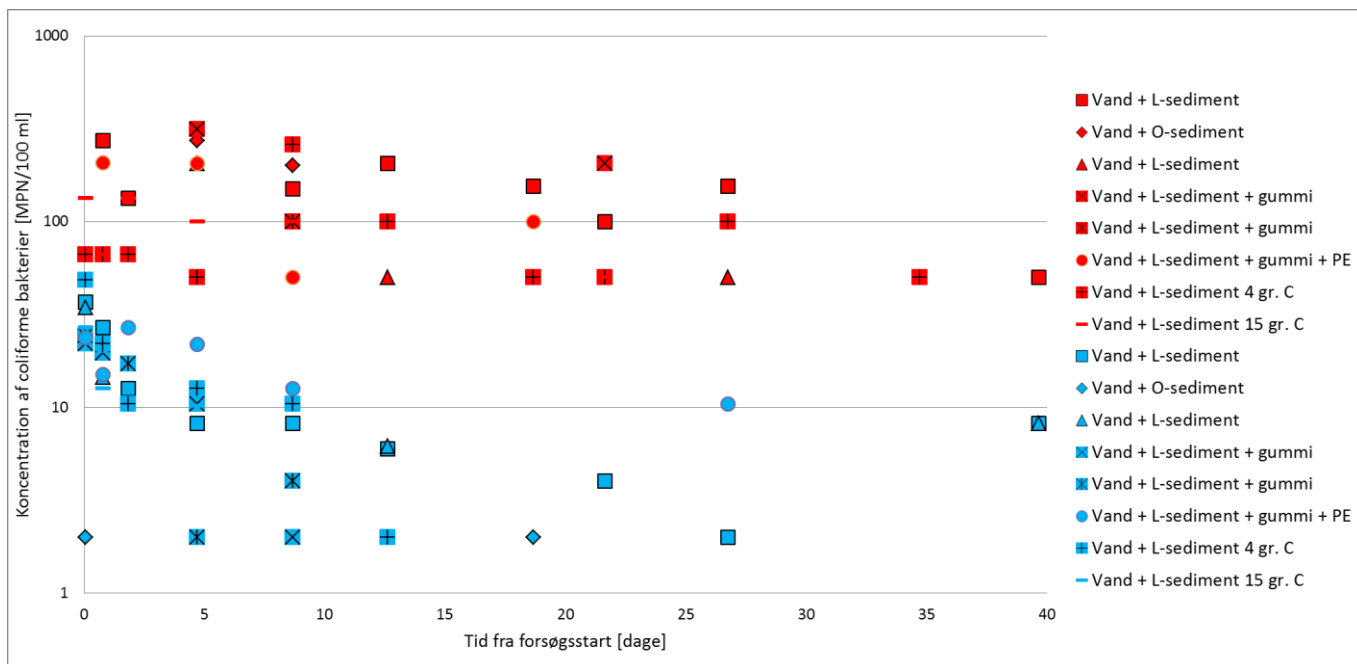
rør er kilde til opformering af coliforme bakterier i ledningsnettes hos Halsnæs Vandforsyning. Tilsætning af næringsmedie førte til en højere koncentration af coliforme bakterier i biofilmen på gummistykkerne end hvor næring ikke var tilsat (Tabel 5). Dette gjorde sig ligeledes gældende for den totale aktivitet af bakterier målt ved ATP. Tilførsel af næring til bakterier i biofilm er markant anderledes i systemer med flow, såsom ledningsnet, end i stillestående batchforsøg udført i dette studie. Det kan derfor ikke udelukkes, at vækst af coliforme bakterier foregår på disse overflader i ledningsnet, hvor der er en kontinuerlig tilførsel af næringsstoffer.

Ved tilstedeværelse af sediment faldt koncentrationen i vandfasen hurtigere, end når der ikke var sediment i forsøgsglassene (Figur 8). Forsøgsglasset med en anden type sediment (O-sediment) end i de øvrige glas skilte sig ud ved, at koncentrationen af coliforme bakterier gennem hele forsøget var markant lavere end i de øvrige glas. Ved mikroskopi af sedimentet fra Odense ved forsøgets afslutning, kunne det konstateres, at koncentrationen af andre bakterier end *Serratia* var markant højere end i de øvrige sedimentprøver, og konkurrenceforhold kan derfor være medvirkende til den lave koncentration af coliforme bakterier.



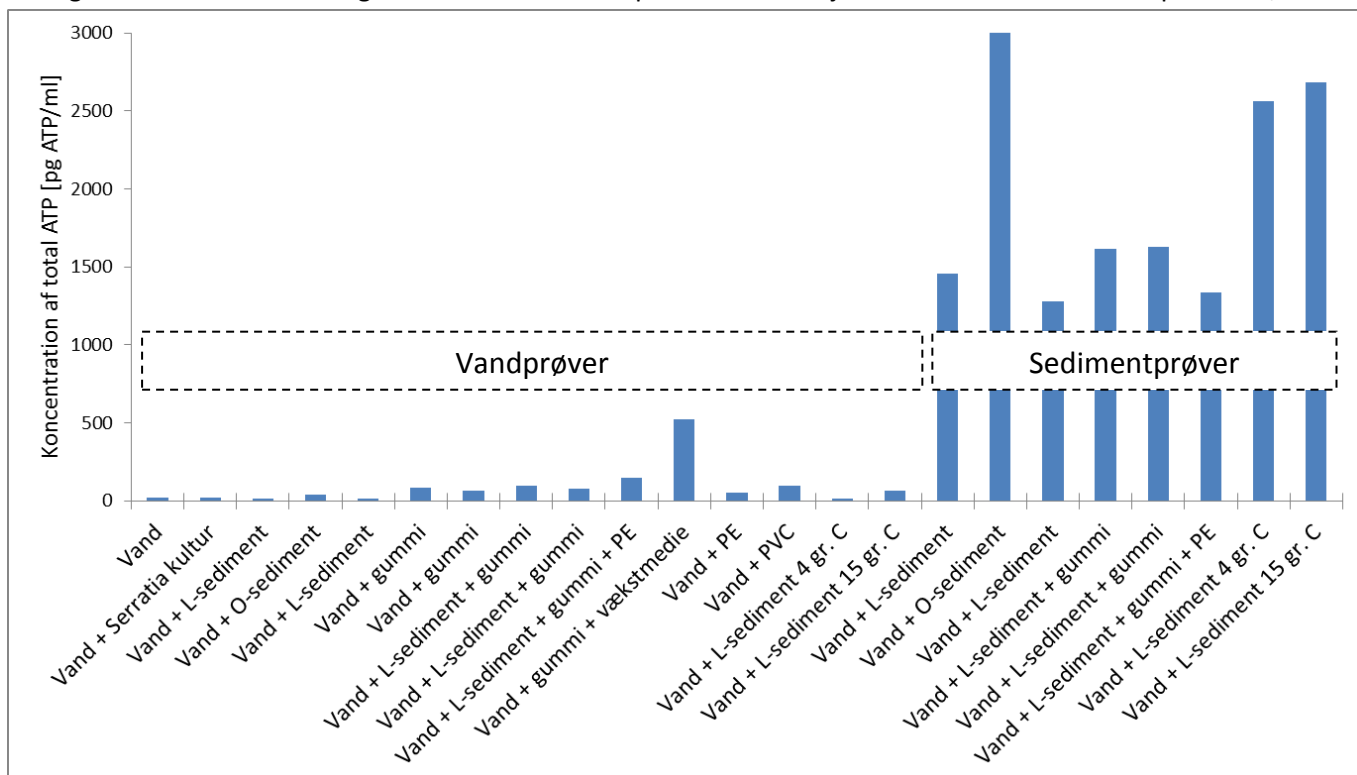
FIGUR 8. UDSNIT AF FIGUR 4 MED FOKUS PÅ FORSKELLEN MELLEM KONCENTRATION AF COLIFORME BAKTERIER I VANDFASEN I FORSØGSGLAS MED VAND OG FORSØGSGLAS MED VAND + SEDIMENT. L-SEDIMENT ER DRIKKEVANDSSSEDIMENT FRA LYNÆS, O-SEDIMENT ER DRIKKEVANDSSSEDIMENT FRA ODENSE. FORSØGSGLASSENE BLEV INKUBERET VED 10 °C.

Det umiddelbare fald i koncentration af coliforme bakterier ved tilstedeværelse af sediment skyldes ikke alene henfald af bakterierne men også en relokalisering af coliforme bakterier fra vandfase til sediment. De højeste coliforme koncentrationer blev således målt i sedimentet gennem hele forsøget (Fig. 9), og fem af de seks forsøgsglas med overlevende coliforme bakterier ved forsøgets afslutning indeholdt sediment (Fig. 5).



FIGUR 9. KONCENTRATION AF COLIFORME BAKTERIER I DE OTTE FORSØGSGLAS MED SEDIMENT TILSAT. FOR HVERT GLAS VISES KONCENTRATIONEN AF COLIFORME BAKTERIER OVER TID I BÅDE SEDIMENT (RØDE SYMBOLER) OG VANDFASE (BLÅ SYMBOLER). KONCENTRATIONER <1 MPN/100 ML ER IKKE VIST.

Højere koncentrationer i sediment end vand var gældende for såvel coliforme bakterier som den totale bakterielle aktivitet målt som ATP på dag 35 (Fig. 10). De højeste ATP niveauer blev målt i glasset, der ved forsøgsstart blev tilført næringsmedie. Alle sedimentprøver havde højere ATP-niveauer end vandprøverne, i



FIGUR 10. ATP-INDHOLD I VANDPRØVER OG SEDIMENTPRØVER FRA ALLE GLAS PÅ DAG 35.

særdeleshed prøven med sediment fra Odense, hvilket også blev konstateret ved mikroskopi.

For at forfølge hypotesen om, at bakterier i ledningsnettet vil forekomme i højere koncentrationer i sediment end drikkevand, blev der udtaget fire vandprøver d. 4. juni 2015 til måling af turbiditet og coliforme bakterier. Tre af prøverne havde en turbiditet $<0,1$ NTU. I disse prøver var koncentrationen af coliforme bakterier 1, 2 og 11 MPN/100 ml. I prøven med en turbiditet på 0,95 NTU var koncentrationen 32 MPN/100 ml. Der kan ikke drages konklusioner ud fra fire prøver alene, men prøverne understøtter hypotesen om at coliforme bakterier opkoncentreres i sediment. Yderligere prøver med koblede turbiditet- og Colilert-målinger vil kunne bidrage til at undersøge, om de høje koncentrationer af coliforme bakterier i vandprøver forekommer, når der hvirvles sediment op i vandfasen. Der vil dog også kunne frigives bakterier fra sediment til vandfase, uden at partiklerne hvirvles op.

Halsnæs Vandforsyning har sektioneret området og derved registreret, at indløbsvandet til en zone som regel har koncentrationer af coliforme bakterier på nul eller få coliforme bakterier/100 ml, mens de fjerneste målepunkter i en zone oftest har de højeste koncentrationer. Når zonerne "vendes", så vandet løber til zonen fra den modsatte side, registreres der ligeledes et skift i forekomsten af høje og lave koncentrationer af coliforme bakterier. Dette er registreret i flere forskellige zoner. Det grundige arbejde med zoneinddeling og forsøg med skiftende flowretninger samt fyldestgørende dokumentation heraf giver værdifuld information i forhold til spørgsmålet om, hvorvidt der foregår vækst i systemet af en overlevende population eller er en fortsat ekstern forureningskilde. Sammenholdes data med resultaterne fra DNA analysen, der viste, at arter fra december 2014 og april 2015 var identiske, er det ikke sandsynligt, at der er en fortsat ekstern kilde. I så fald skulle forureningen, der tilføres i flere forskellige zoner, bestå af identiske coliforme bakterier uden tilstedeværelse af andre coliforme bakterier. Derudover vil en punktkilde typisk medføre et "centrum" med høj koncentration og faldende koncentrationer bort fra dette centrum.

Da drikkevandssystemer som andre akvatiske systemer udgør komplekse økosystemer, er der mange faktorer, der kan gøre sig gældende i forhold til overlevelse af coliforme bakterier. Ud over fx næring, plads, konkurrenter og temperatur kan predation (græsning) også være en betydende faktor. Selvom predation ikke var i fokus i dette studie, blev alle sedimentprøver afslutningsvis mikroskoperet for at lave et estimat af forekomsten af protozoer (encellede organismer), der kan græsse på bakterier. I forsøgsglasset inkuberet ved 15 °C og med en hurtigt aftagende koncentration af coliforme bakterier var koncentrationen af protozoer i sedimentet ca. tre gange højere end i de øvrige glas. De øvrige sedimentprøver havde ens niveau af protozoer bortset fra sedimentet fra Odense, hvori der ikke blev observeret protozoer. Også dette forsøgsglas skilte sig ud fra de øvrige ved en meget lav koncentration af coliforme bakterier gennem hele forsøget. Sammenhængen er altså ikke simpel da høje protozo-koncentrationer eksempelvis kan føre til øget græsning af alle bakterier, mens ingen protozoer kan medføre et generelt højt bakterieniveau, hvilket kan udkonkurrere specifikke grupper af bakterier som fx langsomt-voksende coliforme bakterier.

Konklusioner

Der blev målt coliforme bakterier i alle vand og biofilm-prøver udtaget på ledningsnettet d. 29. april 2015. Overlevelsesh-/vækstforsøg ved 10 °C med vand fra ledningsnettet viste, at de coliforme bakterier overlevede i hele projektets prøvetagningsperiode på 43 dage. Overlevelsen var bedst i forsøgsglas med vand og sediment eller vand alene.

Der blev målt vækst af coliforme bakterier i forsøget men kun i forsøgsglas med tilsætning af næringsmedie i høje koncentrationer. Vækst blev observeret både ved forsøgets begyndelse og ved forsøgets afslutning i glas, hvor koncentrationen var faldet til 2 MPN/100 ml. Der er derfor et potentiale for genvækst selv ved lave koncentrationer af coliforme bakterier.

Koncentrationerne af coliforme bakterier i biofilm på rør og gummistykker var højest umiddelbart efter rørstykket var skåret ud af ledningsnettet. I forsøgsglas med rørstykker eller gummistykker faldt koncentrationen af coliforme bakterier i biofilmen og i vandet over tid. Det kunne dog observeres, at der over tid voksede en slimet biofilm på gummistykkerne, hvori et relativt højt niveau af mikrobiel aktivitet af ikke-coliforme bakterier blev målt ved ATP. Tilstedeværelsen af coliforme bakterier på rør og gummistykker ved udtagning fra ledningsnettet indikerer, at der i ledningsnettet er et potentiale enten for vækst eller opkoncentrering af coliforme bakterier i biofilm, som vi ikke var i stand til at eftervise i disse forsøg. Det kan skyldes, at biofilm i ledningsnet løbende får tilført friskt vand med højere næringsindhold end i disse batchforsøg.

Gennem hele forsøget blev de højeste koncentrationer af coliforme bakterier målt i sedimentet, og overlevelsesgraden var højere i glas med sediment end uden sediment. Drikkevandssediment kan dermed bidrage til opkoncentrering af coliforme bakterier og forøget overlevelse.

I det enkelte forsøgsglas, der blev undersøgt ved 4 °C, overlevede bakterierne gennem hele forsøget, mens koncentration faldt hurtigt i forsøgsglasset ved 15 °C. Sammenhængen mellem temperatur og overlevelse er dog ikke nødvendigvis simpel, da andre faktorer såsom konkurrence og predation gør sig gældende. Eksempelvis var koncentrationen af protozoer, der kan spise bakterier, højere i forsøgsglasset inkuberet ved 15 °C end i de øvrige glas.

DNA analyser viste, at de coliforme bakterier var tættest beslægtet med *Serratia fonticola* (98,4 % lighed). Coliforme bakterier i ledningsnetprøver fra december 2014 og april 2015 var identiske ved DNA analysen (100 % lighed).

Taksigelser

Tak til Halsnæs Vandforsyning for vidensdeling og for at stille alle nødvendige prøver og analyseresultater til rådighed gennem hele projektet. Sabrina Nedell takkes for teknisk assistance og sparring.

Referencer

Bollet, C, Gainnier, M, Sainly, J-M, Orhesser, P, de Micco, P (1991) *Serratia fonticola* isolated from a leg abscess. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 834-835.

Carneiro, A R, Jucá Ramos, R T, Baraúna, R A, et al. (2013) Draft Genome Sequence of *Serratia fonticola* LMG 7882^T Isolated from Freshwater. *Genome Announcements*, 1(6).

Gavini, F, Ferragut, C, Izard, D, Trinel, P A, Leclerc, H, Lefebvre, B, Mossel, D A A (1979). *Serratia fonticola*, a new species from water. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29: 92–101.

Grimont, F & Grimont P A D (2006) Springer. 3rd Edition. New York: Prokaryotes. The Genus *Serratia*. In: Dworkin, M, Falkow, S, Rosenberg, E, Schleifer, K H, Stackebrandt, E, pp. 219–244.

Guldbæk, I & Bagge, L (2007) Vurdering af metodeskift for coliforme bakterier i drikkevand, Miljøstyrelsen, Miljøprojekt 1162.

DS/EN ISO 9308-1 (2001, 1.udg.) Vandundersøgelse – påvisning og bestemmelse af *Eschericia coli* og coliforme bakterier – Del 1: membranfiltreringsmetode.

WHO (2011): Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth Edition. Geneva: World Health Organization (WHO).